STANFORD MAR 8 1938 LIBRARY

Aus dem Hygienischen und Pharmakologischen Institut
der Universität Heidelberg
Direktoren: Professor Dr. E. Rodenwaldt und
Professor Dr. F. Eichholtz

Lane Medical Library

# Das Vorkommen des Bakterium acetylcholini in der Mundhöhle und im Darm der weißen Ratte

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
einer hohen medizinischen Fakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

Vorgelegt von
HELMUTH THOMA
aus Laufenburg (Baden)

Laufenburg (Baden)
Alfons Schmidle, Buchdruckerei
1937

Aus dem Hygienischen und Pharmakologischen Institut
der Universität Heidelberg
Direktoren: Professor Dr. E. Rodenwaldt und
Professor Dr. F. Eichholtz

# Das Vorkommen des Bakterium acetylcholini in der Mundhöhle und im Darm der weißen Ratte

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
einer hohen medizinischen Fakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

Vorgelegt von
HELMUTH THOMA
aus Laufenburg (Baden)

Laufenburg (Baden)
Alfons Schmidle, Buchdruckerei
1937

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät.

| Dekan: | Referent: |
| --- | --- |
| Prof. Dr. Schneider. | Prof. Dr. Habs. |

Die Karies der Zähne wird nach den grundlegenden Untersuchungen von Miller eingeleitet durch eine bakteriell bedingte Kohlehydratgärung. Jede Suche nach einem spezifischen Kariesbakterium ist jedoch erfolglos betrieben; es ist vielmehr anzunehmen, daß eine Reihe verschiedener Bakterienarten in Betracht kommen, deren normaler Standort die Mundhöhle ist.

Die wesentliche Rolle unter diesen spielen, neben Bakterien aus der Gruppe Acidobakterien bezw. Plocamobakterien, nach allen Untersuchern die Streptokokken. Es herrscht aber in der Literatur eine erhebliche Verwirrung, zu welchen Arten diese bei Karies gefundenen Streptokokken gehören. Diese Unklarheit ist nicht zum geringsten Teil dadurch mitbedingt, daß die Systematik der Streptokokken noch keineswegs als abgeschlossen gelten kann. Besonders groß sind die Unterschiede in der Aufteilung und Nomenklatur gewißer Streptokokkengruppen durch die medizinische Bakteriologie einerseits, die Gärungsbakteriologie andererseits, hervorgerufen durch die verschiedene Zielrichtung dieser Arbeitsgebiete und durch die verschiedenen Arbeitsmethoden. — Als erschwerend für die Systematik kommt weiter hinzu, daß Variations- und Anpassungsvorgänge der Bakterien eine noch nicht zu übersehende Rolle spielen.

Nach Lehmann und Neumann können die hier in Betracht kommenden Streptokokken zwei Arten zugeteilt werden: dem Streptokokkus pyogenes Rosenbach und dem Streptokokkus acidi lactici Grotenfeldt (Streptokokkus lacticus Kruse. Streptokokkus lactis [Lister] Löhnis).

Der Streptokokkus pyogenes wird nach dem Vorgang von Schottmüller in zwei Unterarten aufgeteilt, den Streptokokkus longus von Lingelsheim, der durch sein starkes Haemolysierungsvermögen auf Blutagar gekenn-

zeichnet ist und dementsprechend als „haemolytischer Streptokokkus“ bezeichnet wird, und den Streptokokkus mitior seu viridans Schottmüller, der auf Blutagar keine oder unbedeutende haemolytische Höfe bildet.

Wohl von allen bisherigen Untersuchern wird angegeben, daß die haemolytischen Streptokokken, die die typischen menschenpathogenen Streptokokken darstellen, bei der Entstehung der Karies keine Rolle spielen. Kantorowicz bezeichnet nach dem Verhalten auf der Blutplatte die Kariesstreptokokken als Streptokokkus mitior. Doch ist von ihm offenbar diese Bezeichnung nicht in dem jetzt üblichen engeren Sinne, der ausschließlich den Erreger der Endocarditis lenta erfaßt, verwendet, sondern lediglich im Gegensatz zum Streptokokkus haemolyticus als Sammelname für alle nichthaemolysierenden Stämme einschließlich der Milchsäure-Streptokokken. Eine Abgrenzung gegen den Streptokokkus acidi lactici ist von Kantorowicz nicht versucht, es wird vielmehr gerade auf das Säurebildungsvermögen dieser Streptokokken hingewiesen. Auch Becker rechnet die Kariesstreptokken zu dem Streptokkus pyogenes bezw. zu dessen Viridansunterart.

Eine andere Gruppe von Autoren, von denen vor allem Kruse, Seitz, Hilgers und Sperling zu nennen sind, vertrat demgegenüber die Ansicht, daß die bei der Zahnkaries gefundenen Streptokokken als Streptokokkus acidi lactici anzusehen seien.

Dieser Streptokokkus ist der wichtigste Milchsäurebildner der in der Kälte spontan gesäuerten Milch. Durch Heim ist er eingehend beschrieben worden und durch sein Verhalten in der Lackmusmilch von den übrigen Streptokokken abgegrenzt worden. Aufgrund dieser Abgrenzung konnte Schlirf nachweisen, daß die Mundstreptokokken und Kariesstreptokokken weder zu der Gruppe des Streptokokkus viridans noch zu der Gruppe des Streptokokkus acidi lactici gehören, daß sich vielmehr verschiedene Arten finden, z. T. gut unterscheidbare, vor allem ein als Streptokokkus lapillus Heim bezeichneter Keim.

In dem letzten Jahrzehnt ist wiederholt diese Gruppe der im Verdauungskanal vorkommenden (vergl. z. B. Gundel) nicht haemolysierenden, säurebildenden pleomorphen Streptokokken systematisch bearbeitet worden. Insbesondere wurde versucht, unter ihnen den Enterokokkus oder

Streptokokkus ovalis als besondere Art herauszuarbeiten. Wie die Arbeit von Erismann zeigt, ist es jedoch nicht möglich.

Die Gruppe dieser Streptokokken besitzt Beziehungen zu denjenigen Bakterien, die als Milchsäurebildner in der Gärungsbakteriologie eine wichtige Rolle spielen. Bei den nahen Beziehungen zwischen dem Magendarmkanal des Menschen und der Tiere einerseits, den Vorgängen bei der Gärung der Nahrungsmittel andrerseits, ist sogar damit zu rechnen, daß gewisse Arten und Varietäten identisch sind.

Auch die Gärungsmikroorganismen sind von systematischem Standpunkt aus noch ungenügend untersucht, da oft nur die technisch wichtigen Vertreter dieser Gruppe eingehend beschrieben werden, andere Arten aber lediglich nach ihrem Vorkommen in einem bestimmten Medium benannt werden.

Unter den „wilden Milchsäurebildnern" konnte durch die Untersuchungen von Keil eine Gruppe von Bakterien abgetrennt werden, die beim Silageprozeß die Milchsäuregärung bedingen. Und zwar gelang Keil der grundlegende Nachweis, daß diese Bakterien außer der Fähigkeit, den Zucker in Milchsäure zu zerlegen, die weitere Eigenschaft besitzen, Acetylcholin zu bilden. Der Nachweis der Acetylcholinbildung erfolgt durch einen einfachen pharmakologischen Versuch, nämlich dadurch, daß man die Kulturen auf einen isolierten, in Tyrode lebenden Rattendarm einwirken läßt. — Die Bedeutung dieses Bakteriums für den volkswirtschaftlich so wichtigen Silagevorgang ist von Eichholtz und Keil sowie Eichholtz und Brehm dargestellt worden. Die Stoffwechseleigenschaften dieses Bakteriums sind teilweise durch Keil und Weyrauch untersucht worden.

Das morphologische Verhalten dieses Mikroorganismus wechselt zwar nach den Kulturbedingungen; er gehört jedoch zweifellos zu den Streptokokken. Da die Möglichkeit nahe lag, daß dieser Keim Beziehungen zu den Streptokokken des Verdauungskaktus besitzt, waren bereits früher durch Keil eine gewisse Reihe von Streptokokkusstämmen untersucht worden, die Habs aus der Mundhöhle, dem Darminhalt und aus Milch mit den übrigen Methoden isoliert hatte. Bei keinem dieser Stämme war aber eine Acetylcholinbildung nachweisbar gewesen.

Eine Wiederaufnahme ähnlicher Versuche erschien mit größerer Erfolgaussicht angebracht, nachdem eine Kulturmethode zur Isolierung dieser Bakterienart aus dem natürlichen Bakteriengemisch ausgearbeitet worden war, mittels der aus verschiedenen natürlich gesäuerten Gemüsekonserven und Silagen reine Stämme der neuen Art isoliert werden konnten.

Ich habe deshalb die Frage in Angriff genommen, ob sich dieser wohlcharakterisierte Milchsäurebildner in der Mundhöhle, insbesondere an kariösen Zähnen nachweisen läßt.

## Methode der Reinzüchtung.

Die früheren Versuche waren daran gescheitert, daß gleichzeitig mit der fraglichen Bakterienart große Mengen von anderen Bakterienarten sowie von Schimmelpilzen und Hefen angingen. Diese verzehren sehr rasch die von den acetylcholinbildenden Bakterien gebildete Milchsäure. Das Medium wird also alkalisch, sodaß auch möglicherweise gebildetes Acetylcholin durch die Alkaleszens zerstört wird. Das Wachstum derartiger Hefen und Schimmelpilze muß also von vornherein unterdrückt werden. Dies gelang uns, indem wir Kulturen in Gurkensaft anlegten, der mit Hilfe von Salzsäure auf einen pH Wert von 4,5 gebracht war, und mit Paraffin luftdicht abgeschlossen wurde. In je 5 ccm dieser Nährflüssigkeit brachten wir ein 1 — 5 mg großes Stückchen des zu untersuchenden Materials. Bei Zimmertemperatur im Dunkeln erfolgte die Entwicklung in 1 — 4 Tagen. Zwecks Reinigung von fremden Keimen wurde am 3. oder 4. Tage eine kleine Menge der Kultur mit steriler Kapilarpipette auf neuen Gurkensaft überimpft und die Passage mehrfach wiederholt. Die Prüfung auf Acetylcholin durch Auswertung am Rattendarm erfolgte jeweils am vierten Tage nach der Animpfung.

In den ersten Versuchsreihen sollte nachgewiesen werden, daß es mit Hilfe der beschriebenen Methode gelingt, das Bakterium acetylcholini auch aus dem natürlichen Bakteriengemisch des Magendarmkanals zu isolieren.

Zu diesem Zweck fütterten wir einer normalen weißen Ratte etwa 1 ccm eines aus einer Silage gezüchteten Bak-

terienstamms, der auf Gurkensaft Acetylcholin bildete. Nach einer Stunde wurde das betreffende Tier getötet und vom Inhalt des Magens und der einzelnen Abschnitte des Darmtraktus je 2 Ösen steril entnommen und auf Gurkensaft mit pH 4,5 überimpft. Die Acetylcholinbestimmung ergab, daß im Magen keine Acetylcholinbildner vorhanden waren, während in allen anderen Darmabschnitten mehr oder weniger Acetylcholin nachweisbar war.

Zwei weitere Versuche mit Ratten, die wir nach 2 bezw. 4 Stunden nach der Fütterung mit den Acetylcholinbildnern töteten, zeigten, daß sich diese Bakterien hauptsächlich im Dünndarm, unterer Teil, Blinddarm und Dickdarm befanden.

Ein Versuch, bei dem wir das Bakterium acetylcholini auf Gurkensaft mit pH 1,0 — 1,5, also dem Magen ähnlichen Verhältnissen, zu züchten versuchten, bewies uns, daß unter diesen Verhältnissen kein Wachstum möglich ist.

Die Untersuchung des Magendarmtraktus einer normalen Ratte ergab, daß sich auch beim normalen Tier im Dünndarm, unterer Teil, Blinddarm und Dickdarm Bakterien befinden,die Acetylcholin bilden, d. h. die Darmbewegung steigern. Bei allen anderen Darmabschnitten war der Befund negativ.

Die Reinzüchtung aus Menschenkot ist uns bis jetzt noch nicht mit Sicherheit gelungen.

Nachdem durch die geschilderten Versuche erwiesen war, daß durch die beschriebene Isolierungsmethode die verfütterten Bakterien wieder gezüchtet werden konnten, wurde das gleiche Verfahren auf eine nicht vorbehandelte Ratte angewandt, und dieser Versuch zeigte uns, daß beim normalen Tier die Acetylcholinbildner zur normalen Darmflora gehören.

Nachdem die Versuche günstig ausgefallen waren, konnte an die Aufgabe gegangen werden, den Nachweis dieses Bakteriums in der Mundhöhle und an kariösen Zähnen zu führen.

Um diese Frage zu klären, untersuchten wir nach obiger Methode 40 verschiedene kariöse Zähne und ebenso viele Zahnbeläge. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß in den ersten 5 Tagen der Gurkensaft steril blieb,

sowohl bei den Abstrichen aus kariösen Zähnen wie aus Zahnbelägen. Wir warteten nun jeweils 4 Tage bis zur Acetylcholinbestimmung und überimpften vorher noch auf neuen Gurkensaft. Es gelang auf diese Weise festzustellen, daß in dem untersuchten Material Acetylcholinbildner vorkommen. Bei den Kulturen aus kariösen Zähnen und aus Zahnbelägen war die Acetylcholinbestimmung allerdings nur in 4 bezw. 3 Fällen positiv. Es scheint also die Tatsache zu bestehen, daß das Bakterium acetylcholini in der Mundhöhlenflora nur in geringer Zahl vertreten ist.

Um zu beweisen, daß sich die Acetylcholinbildner wirklich in der Mundhöhle aufhalten können, ohne Schaden zu leiden, brachten wir von der aus der Silage gezüchteten Bakterienkultur etwa 1 ccm in 20 ccm $H_2O$ und ließen diese etwa 5 Minuten in der Mundhöhle, machten nach 1 Stunde Abstriche von den Zähnen und der Gingiva und legten nach beschriebener Methode Kulturen an. Hierbei zeigte es sich, daß in allen Fällen Acetylcholinbildung vorhanden war, daß das Bakterium also in der Mundhöhle leben kann. Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, daß unter den Streptokokken der Mundhöhle sich auch der acetylcholinbildende nachweisen läßt. Es wird in weiteren Untersuchungen festzustellen sein, welche Rolle dieser Keim bei der Entstehung der Karies spielt.

Die jetzt gelungene Züchtung des Acetylcholinbildners aus dem Rattendarm und aus der menschlichen Mundhöhle stand in gewissem Gegensatz zu unseren oben genannten früheren Untersuchungen.

Es war deshalb zu prüfen, ob es sich bei den in Gurkensaft gezüchteten Kulturen um Reinkulturen handelte, ob sich die Keime auf anderen Nährboden isolieren lassen und ob dann von Einzelkolonien aus in Gurkensaft wieder Acetylcholinbildung eintritt, ob ferner Unterschiede gegenüber den aus der Silage gezüchteten Stämmen bestehen.

Zu diesen Untersuchungen wurden zunächst 2 Kulturen der gefütterten Ratte, 3 Kulturen der ungefütterten Ratte, 1 Normalkultur (Silage) und 1 aus Zahnbelag ausgewählt. Die Überimpfung erfolgte auf Nähragarplatten, auf Lakmusmilch-Zucker-Agarplatte nach Drigalski und auf Blutagarplatten.

Auf allen Platten wachsen sowohl bei 20° wie bei 37° ausschließlich unter sich gleiche, feine Kolonien, auf Agar

zart und durchscheinend, auf Drigalskiagar ohne wesentliche Veränderung der Lakmusfarbe, auf Blutplatten etwas dichter, weißlich aussehend mit grünem bis schwarzem Hof. — Mikroskopisch handelte es sich um grampositive pleomorphe Diplokokken. Von je einer Einzelkolonie von Blutagar wurde eine neue Kultur auf Blutagar angelegt. Nach 3 derartigen Passagen über Einzelkolonien, bei denen niemals abweichende Kolonieformen beobachtet werden konnten, konnten die Kulturen als sichere Reinkulturen betrachtet werden. Mit diesen Kulturen wurden Gurkensaftröhrchen beimpft; die Acetylcholinbestimmung fiel jeweils positiv aus.

Um eine Einordnung der Bakterienstämme in die Systematik, die in der medizinischen Bakteriologie üblich ist, in die Wege zu leiten, wurden zunächst von 7 Reinkulturen aus Röhrchen mit Aeskulinbouillon beimpft. Durch Zusatz von Eisenzitrat nach 48 Stunden trat bei allen Kulturen Schwärzung ein. Der positive Ausfall der Aeskulinspaltung ist ein weiteres Merkmal für die Abtrennung des Acetylcholinbildners von den echten Milchsäurestreptokokken. — Diese Reaktion würde ebenso wie das Verhalten auf der Blutplatte das neu beschriebene Bakterium gleichzeitig in die Nähe der sogen. Enterokokken stellen. Abweichend von diesen ist allerdings das Verhalten in Lakmusmilch. Die meisten von unseren Stämmen riefen in dieser nur geringe Rötung hervor. Auch dieses Verhalten gibt dem Bakterium wieder eine Sonderstellung gegenüber dem Streptokokkus acidi lactici.

Es würden weitere ausgedehnte systematische Untersuchungen an einer größeren Reihe von Stämmen erforderlich sein, um festzustellen, inwieweit sich die Acetylcholinbildner auf den üblichen differential-diagnostischen Nährböden einheitlich verhalten und in wieweit auch ohne Zuhilfenahme des Acetylcholinnachweises eine Abgrenzung von ähnlichen Milchsäurebildnern gelingt.

Es werden dann weitere eingehendere Untersuchungen über das Vorkommen des Bakteriums acetylcholini bei Menschen und Tieren möglich sein. — Schon jetzt führt die Tatsache des Auffindens des gleichen Bakteriumsstammes in der Silage und in gesäuertem Gemüse einerseits, in der Mundhöhle und im Darm andererseits zu einer neuen Aufrollung der Frage der Beziehungen der Erd-

bakterien zu den Darmbakterien. Die spezielle Frage der Beziehungen dieser Bakterienart zur Entstehung der Zahnkaries wird ebenfalls durch weitere Untersuchungen geklärt werden können.

---

## Zusammenfassung.

Durch Anwendung der oben angegebenen elektiven Kulturmethode gelang uns der Nachweis des Bakteriums acetylcholini im Magendarmkanal von Ratten, die mit diesem Bakterium gefüttert waren, wie auch im Darmtraktus der normalen Ratte. Ebenso konnten wir nachweisen, daß das Bacterium acetylcholini in kariösen Zähnen und Zahnbelägen von Menschen, wenn auch in geringer Anzahl, vorkommt und daß die gezüchteten Stämme Reinkulturen waren, die sich bei den verschiedenen Prüfungen auf differential-diagnostischen Nährböden ebenso verhalten, wie die aus einer Silage gezüchtete Reinkultur.

---

## Literatur.


1. Becker, J.: Untersuchung über Zahnkariesstreptokokken; D. M. Z. 1923, 308.
2. Keil W. und Mitarbeiter: Zur Pharmakologie und Chemie vergorener Nahrungsmittel: I.-V. V. Mitteilung. W. Keil und L. Weyrauch: Weitere Versuche über das acetylcholinbildende Bakterium: Z. Bakt. II (1937) im Druck.
3. Eichholtz F. und W. Keil: Über die chemischen und biologischen Vorgänge bei der Silage. Chem. Ztg. 59; (1935) S. 1033.
3. a) Eichholtz F. und K. Brehm: Pressaftsilage: Sitzungsber. d. Heidelb. Akad. d. Wiss. math. nat. Kl. (1935) Abhdlg. 9.
4. Erismann, O.: Über die differential-diagnostische Abgrenzbarkeit der Enterokokken; Z. H. 117, 307/40, 1935.
5. Grotenfeldt: Streptokokkus acidi lactici. Fortschr. Med. Z. 124. 1889.
6. Gundel, M.: Die Typenlehre in der Mikrobiologie; S. 30 f. Jena, 1934.
7. Helm, L.: Milchsäure- und andere Streptokokken; Z. H. 101, 1923, 104.
8. Hilgers, H.: Streptokokken der Zahnkaries; D. M. Z. 1921, Jg. 39.
9. Kantorowicz, A.: Handbuch der Zahnheilkunde II, 31: Die Bakterien der Zahnkrankheiten.
10. Kruse, W.: Das Verhältnis der Milchsäurebakterien zum Streptokokkus lanceolatus; Zb. I. 34. 1903.
11. Lehmann-Neumann: Bakteriologische Diagnostik; II. 208 1927.
12. Miller, W. D.: Die Mikroorganismen der Mundhöhle; Leipzig 1899.
13. Nißle: Untersuchungen über das Kariesproblem; M. m. W.
14. Niedergesäß, K.; Aciditätsuntersuchungen; A. H. 84, 220. 1915.
15. Schlirf, K.; Bakteriologische Untersuchungen über die Zahnkaries; Cb. B. 99, 126. 1926.
16. Seitz, A.: Die Differenzierung der Streptokokken der Mundhöhle; C. B. 89, 135—43. 1923.
17. Schottmüller, H.: Über die Artverschiedenheit der Streptokokken; M. m. W. 1904, 1009.
18. Sperling, H.: Der Streptgkokus lacticus und seine Beziehungen zur Zahnkaries; D. M. Z. 1922, 129.

Zum Schluße meiner Arbeit möchte ich vor allem den Herrn Professoren Dr. F. Eichholtz und Dr. E. Rodenwaldt für die Überlassung der Arbeit und der Arbeitsplätze meinen besten Dank aussprechen. Ebenso möchte ich Herrn Dozent Dr. H. Habs für seine freundliche Unterstützung und seine Ratschläge recht herzlich danken.

## Lebenslauf.

Ich, Helmuth Thoma, wurde am 29. 11. 1911 in Basel als Sohn des Kaufmanns Emil Thoma, geboren. Nach fünfjährigem Volksschulbesuch in Wehr a. Schopfheim trat ich am 18. 4. 1923 in die Oberrealschule in Schopfheim ein, an der ich am 16. März 1932 das Reifezeugnis erwarb. Nach viersemestrigem Studium der Zahnheilkunde an den Universitäten Basel und Heidelberg, bestand ich im WS. 1934 in Heidelberg die zahnärztliche Vorprüfung. Nun studierte ich 2 Semester an der Universität Basel und legte im WS. 1935 an der Universität Heidelberg das zahnärztliche Staatsexamen ab.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.